

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Predavec**

**Serumska cirkulirajuća DNA kao biljeg  
invazivnosti trofoblasta i tumora**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

<b>AP1</b>	aktivirajući protein 1 (engl. <i>Activating protein 1</i> )
<b>BMP</b>	koštani morfogenetski proteini (engl. <i>Bone morphogenic proteins</i> )
<b>BRCA1</b>	engl. <i>BReast CAncer gene 1</i>
<b>BRCA2</b>	engl. <i>BReast CAncer gene 2</i>
<b>bp</b>	parovi baza (engl. <i>Base pair</i> )
<b>CA125</b>	ugljikohidratni antigen 125 (engl. <i>Carbohydrate antigen 125</i> )
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen
<b>cfDNA</b>	serumska cirkulirajuća DNA (engl. <i>Cell-free DNA</i> )
<b>cffDNA</b>	cirkulirajuća fetalna DNA (engl. <i>Cell-free fetal DNA</i> )
<b>CNV</b>	varijacije u broju kopija (engl. <i>Copy number variation</i> )
<b>CT</b>	kompjuterizirana tomografija
<b>CTC</b>	cirkulirajuće tumorske stanice (engl. <i>Circulating tumor cells</i> )
<b>CTCF</b>	transkripcijski faktor CTCF (engl. <i>CCCTC-binding factor</i> )
<b>ctDNA</b>	cirkulirajuća tumorska DNA (engl. <i>Circulating tumor DNA</i> )
<b>DLBLC</b>	difuzni B-velikostanični limfom (engl. <i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> )
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferaza
<b>EETs</b>	eozinofilne DNA klopke (engl. <i>Eosinophil extracellular traps</i> )
<b>EGFR</b>	receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ff</b>	fetalna frakcija
<b>hCG</b>	humani korionski gonadotropin (engl. <i>Human chorionic gonadotropin</i> )
<b>HIF-1</b>	engl. <i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
<b>HPV</b>	humani papiloma virus

<b>IGF2</b>	inzulinu sličan faktor rasta 2 (engl. <i>Insulin-like growth factor 2</i> )
<b>IKK</b>	engl. <i>Inhibitor of nuclear factor-<math>\kappa</math>B kinase complex</i>
<b>ITM</b>	indeks tjelesne mase
<b>IUGR</b>	intrauterini zastoj u rastu (engl. <i>Intrauterine growth restriction</i> )
<b>LOH</b>	gubitak heterozigotnosti (engl. <i>Loss of heterozygosity</i> )
<b>MAP</b>	srednji arterijski tlak (engl. <i>Mean arterial pressure</i> )
<b>MMP</b>	matriks metaloproteinaze
<b>MSI</b>	mikrosatelitske nestabilnosti (engl. <i>Microsatellite instability</i> )
<b>NGS</b>	sekvenciranje nove generacije (engl. <i>Next Generation Sequencing</i> )
<b>NETs</b>	neutrofilne DNA klopke (engl. <i>Neutrophil extracellular traps</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	engl. <i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>NO</b>	dušikov oksid
<b>NSCLC</b>	nesitnostanični karcinom pluća (engl. <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> )
<b>ODN</b>	oligodeoksinukleotidi
<b>PAPP-A</b>	engl. <i>Pregnancy-associated plasma protein A</i>
<b>PARP</b>	poli (ADP-riboza) polimeraze (engl. <i>Poly (ADP ribose) polymerase</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PE</b>	preeklampsija
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PIGF</b>	placentarni čimbenik rasta (engl. <i>Placental growth factor</i> )
<b>RASSF1</b>	(engl. <i>Ras association domain family member 1</i> )
<b>SLE</b>	sistemni eritematozni lupus
<b>SRY</b>	engl. <i>Sex-determining region Y</i>

<b>TGF-β</b>	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>TLR9</b>	engl. <i>Toll-like receptor 9</i>
<b>TSPY1</b>	engl. <i>Testis-specific protein Y-linked 1</i>
<b>UtAPI</b>	pulsatilni indeks uterine arterije (engl. <i>Uterine artery pulsatility index</i> )

# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	
SUMMARY .....	
1. UVOD.....	1
2. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA .....	3
3. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA KAO BILJEG INVAZIVNOSTI.....	5
TROFOBLASTA .....	5
3.1 Cirkulirajuća fetalna DNA .....	5
4. KOMPLIKACIJE TRUDNOĆE POVEZANE S POREMEĆENOM.....	7
INVAZIJOM TROFOBLASTA .....	7
4.1 Preeklampsija .....	7
4.2 Intrauterini zastoj u rastu .....	9
4.3 Prijevremeni porođaj .....	9
5. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA KAO TUMORSKI BILJEG .....	11
5.1 Cirkulirajuća tumorska DNA .....	11
5.2 Rano otkrivanje malignih tumora.....	12
5.3 Rano otkrivanje relapsa bolesti .....	14
5.4 Praćenje odgovora na terapiju .....	14
6. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA U REPRODUKTIVNIM.....	15
TUMORIMA .....	15
7. ZAKLJUČAK .....	18
8. ZAHVALE .....	19
9. LITERATURA .....	20
10. ŽIVOTOPIS.....	32

# SAŽETAK

## Serumska cirkulirajuća DNA kao biljeg invazivnosti trofoblasta i tumora

**Nina Predavec**

Pojam serumska cirkulirajuća DNA (cfDNA) odnosi se na cirkulirajuće DNA fragmente prisutne u krvi zdravih i oboljelih osoba. Trofoblast i maligni tumori dijele određene karakteristike, poput invazivnosti, sposobnosti metastaziranja i angiogeneze, zbog čega tkivo trofoblasta nazivamo i pseudomalignim tkivom. Stanice trofoblasta i malignih tumora otpuštaju specifične DNA fragmente u krv nazvane cirkulirajuća fetalna DNA (cffDNA) i cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA). cffDNA se primjenjuje u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici trisomije 21, a njezine povišene koncentracije uočene su u komplikacijama trudnoće poput preeklampsije (PE), intrauterinog zastoja u rastu (IUGR) i prijevremenog porođaja. ctDNA se analizira tekućom biopsijom iz uzorka krvi, koja je u odnosu na klasičnu biopsiju brža, efikasnija i minimalno invazivna metoda. ctDNA posjeduje mutacije identične onima u tumorskim stanicama i ima kratko poluvrijeme života, zbog čega može pružiti informacije o trenutnom stanju tumora u organizmu. Cilj ovog preglednog rada je sustavno analizirati i predstaviti dosadašnje spoznaje o cfDNA, cffDNA i ctDNA, budući da njihova primjena može rezultirati boljim dijagnostičkim i terapijskim ishodima.

**Ključne riječi:** serumska cirkulirajuća DNA (cfDNA), cirkulirajuća fetalna DNA (cffDNA), cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA)

## **SUMMARY**

### **Circulating serum DNA as a marker of trophoblast and tumor invasiveness**

**Nina Predavec**

The term cell-free DNA (cfDNA) refers to the circulating DNA fragments present in the blood of healthy and diseased individuals. Trophoblast and malignant tumors share certain characteristics, such as invasiveness, metastasis and angiogenesis, which is why the trophoblast tissue is also called the pseudomalignant tissue. Trophoblast and malignant tumor cells release specific DNA fragments into the blood named the cell-free fetal DNA (cffDNA) and circulating tumor DNA (ctDNA). cffDNA is used in non-invasive prenatal diagnosis for trisomy 21, and its elevated concentrations were observed in pregnancy complications such as preeclampsia (PE), intrauterine growth restriction (IUGR) and premature delivery. ctDNA is analyzed by liquid biopsy from a blood sample, which is faster, more efficient and minimally invasive method, compared to the tissue biopsy. ctDNA displays mutations identical to those in tumor cells and has a short half-life, making it able to provide information about the current state of tumor in the body. The aim of this review is to systematically analyze and present the current cfDNA, cffDNA and ctDNA findings, since their application can result in better diagnostic and therapeutic outcomes.

**Keywords:** cell-free DNA (cfDNA), cell-free fetal DNA (cffDNA), circulating tumor DNA (ctDNA)



## 1. UVOD

Serumska cirkulirajuća DNA (cfDNA) je molekularni biomarker prvi put opisan 1948. godine kada su znanstvenici Mendel i Métais dokazali njezinu prisutnost u uzorcima krvi zdravih i oboljelih pojedinaca (1). Njihovo otkriće potaknulo je brojna istraživanja čiji je cilj utvrđivanje značaja i uloge cfDNA u ljudskom organizmu.

1977. godine Leon i suradnici otvorili su put onkološkoj primjeni cfDNA kada su otkrili da je njena koncentracija viša u bolesnika s malignim tumorima nego u zdravih osoba (2). Desetak godina kasnije znanstvenici Stroun i Anke pokazali su da u krvi postoje fragmenti cfDNA tumorskog podrijetla koji posjeduju nestabilnost specifičnu za tumorsku DNA (3). Na temelju prethodnih spoznaja znanstvenik Vasioukhina otkrio je točkaste mutacije gena *RAS* unutar cfDNA 1994. godine čime je započela era tekuće biopsije u onkologiji (4).

Osim u onkologiji otkriće cfDNA pobudilo je zanimanje znanstvenika i u drugim granama medicine. Tako su Lo i suradnici prvi put opisali cirkulirajuću fetalnu DNA (cffDNA) 1997. godine (5). Tri godine kasnije isti istraživač pokazao je da se više razine cffDNA mogu dobiti iz majčine plazme nego iz stanica u majčinoj krvi (6). On je, također, detektirao više razine cffDNA u trudnoćama zahvaćenima trisomijom 21, što je otvorilo nove mogućnosti uporabe cffDNA u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici (7). Danas se cffDNA koristi, ne samo u probiru (*screeningu*) za trisomiju 21, već i za druge kromosomske aberacije, kao i za pojedine gestacijske bolesti.

Trofoblast i maligni tumori dijele brojne karakteristike poput invazivnosti, sposobnosti metastaziranja i angiogeneze (8). Nedavno je predložena nova molekularna hipoteza o razvoju malignoma epigenetskim reprogramiranjem stanica benignog tumora kojom potonje stječu karakteristike trofoblasta. Prema toj teoriji proliferacijom benignog tumora dolazi do hipoksije i posljedične nekroze centralnih stanica, dok se periferne stanice, koje su manje izložene hipoksiji, prilagođavaju hipoksičnim uvjetima. To dovodi do ekspresije HIF-1 (engl. Hypoxia-inducible factor 1) koji potiče ekspresiju DNA metiltransferaza (DNMT). Metilacija CpG otoka

promotorske regije gena *H19* sprječava vezanje transkripcijskog faktora CTCF (engl. CCCTC-binding factor) i dovodi do ekspresije IGF2 (engl. Insulin-like growth factor 2), karakterističnog za stanice trofoblasta (9).

Osim IGF2 i drugi molekularni markeri zajednički su trofoblastu i malignim tumorima. Protein PAPP-A (engl. Pregnancy-associated plasma protein A) prisutan je u karcinomima jajnika, pluća i melanomima, a inhibicija njegove ekspresije dovodi do prestanka njihovog rasta, invazivnosti i metastaziranja (10)(11)(12). U trofoblastu postoji i pojačana ekspresija matriks metaloproteinaza (MMP) važnih za invazivnost malignih tumora (13). Utvrđeno je da aktivin A povećava invazivnost trofoblasta potičući ekspresiju proteina MMP2 i N-kadherina (14).

U prilog gore navedenoj hipotezi govori i činjenica da je invazivnost trofoblasta i malignih tumora regulirana istim proteinom, TGF- $\beta$  (engl. Transforming growth factor beta). Koštani morfogenički proteini (engl. Bone morphogenic proteins, BMP) najveća su podskupina TGF- $\beta$  superobitelji s više od 20 izoformi. Istraživanja su pokazala da je BMP-2 ključan za decidualizaciju te da ima važnu ulogu u implantaciji i ranoj placentaciji (15). BMP-2 dovodi do povećanja invazivnosti trofoblasta pojačanom aktivacijom proteina N-kadherina preko signalnog puta SMAD2/3 (16). Isto tako, zamjena E-kadherina N-kadherinom dovodi do smanjene invazivnosti trofoblasta i poremećaja placentacije (17). BMP-2 povećava i invazivnost tumorskih stanica, što je uočeno u karcinomu dojke, debelog crijeva, želuca i gušterače, gdje stimulira ekspresiju N-kadherina (18)(19)(20)(21).

Stanice sinciotrofoblasta izlučuju humani korionski gonadotropin (engl. Human chorionic gonadotropin, hCG), protein građen od dviju podjedinica ( $\alpha$  i  $\beta$ ) koje tvore pet molekula: tri  $\alpha$ - $\beta$  heterodimera i dva  $\beta$  monomera (22). Ekspresija proteina  $\beta$ -hCG povezana je s lošom prognozom nekih malignih tumora poput hepatocelularnog karcinoma, karcinoma bubrega, mokraćnog mjehura i kolorektalnog karcinoma (23)(24)(25). U kolorektalnom karcinomu ekspresija proteina  $\beta$ -hCG potiče migraciju i invazivnost stanica induciranjem epitelno-mezenhimalne tranzicije, kojom se i stanice citotrofoblasta transformiraju u invazivni ekstravilozni trofoblast (26).

## 2. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA

Pojam serumska cirkulirajuća DNA (cfDNA) odnosi se na nuklearnu i mitohondrijsku DNA oslobođenu iz stanica, najvećim dijelom tijekom stanične smrti. Ona je prisutna u cirkulirajućim tjelesnim tekućinama (krv, plazma, serum, limfa), necirkulirajućim izvanstaničnim produktima (žuč, majčino mlijeko, urin, stolica, cerebrospinalna tekućina, amnionska tekućina) kao i u tekućinama prikupljenima u određenim patološkim stanjima (ascites) (27). Brzo se uklanja iz cirkulacije te ima poluvrijeme života kraće od 2 sata što ukazuje na ponavljajući ciklus oslobađanja i razgradnje (28).

cfDNA je dvolančana i visoko fragmentirana molekula čija veličina i koncentracija ovise o stanju organizma. Većina DNA fragmenata je kraća od 200 parova baza (engl. Base pair; bp) što približno odgovara veličini nukleosoma (146bp), glavnoj organizacijskoj jedinici DNA u jezgri. Pretpostavlja se da su za to zaslužne nukleaze koje se aktiviraju tijekom apoptoze (29).

U zdravih osoba prosječna koncentracija cfDNA iznosi 2-5ng/mL (30). Synder i suradnici proveli su istraživanje sekvenciranjem cfDNA zdravih pojedinaca. Utvrdili su da nukleosomi posjeduju epigenetske karakteristike mijeloidnih i limfoidnih stanica. Stoga su zaključili da većina cfDNA zdravih pojedinaca potječe od stanica koštane srži te da epigenetske karakteristike nukleosoma mogu upućivati na tkivno podrijetlo cfDNA (31). Danas je poznato da cfDNA, u zdravih osoba, potječe od tkiva s visokim proliferativnim kapacitetom poput hematopoetskih stanica koštane srži te većine površinskog epitela. Više koncentracije cfDNA prisutne su u kroničnim upalnim stanjima poput sistemnog eritematoznog lupusa (SLE), artritisa i hepatitisa. Najviše koncentracije cfDNA imaju bolesnici s malignim tumorima kod kojih prosječna koncentracija cfDNA iznosi 10-1000ng/mL (30).

Način prelaska cfDNA iz unutarstaničnog u izvanstanični prostor značajan je predmet istraživanja. Pretpostavlja se da se odvija apoptozom, nekrozom, fagocitozom i aktivnom sekrecijom (32). Zdrave stanice koriste mehanizme apoptoze i aktivne sekrecije dok tumorske stanice, osim navedenih, koriste i nekrozu te fagocitozu (33)(34). Osim zdravih i tumorskih stanica i stanice tumorskog mikrokoliša (endotelne stanice, stromalne stanice, limfociti)

sudjeluju u otpuštanju cfDNA u krv (35). U krvi, cfDNA može biti prisutna u obliku slobodnih DNA fragmenata, makromolekularnih kompleksa (nukleosomi, virtosomi, DNA klopke), a može se nalaziti i unutar vezikula (apoptotička tjelešca, egzosomi, ektosomi) (36)(37). Navedene strukture štite ju u krvi od razgradnje nukleazama i eliminacije putem imunskog sustava (Tablica 1) (38).

Virtosomi su kompleksi građeni od novosintetizirane DNA, RNA i lipoproteina, a oslobađaju ih isključivo žive stanice (39). 1999. godine García-Olmo i suradnici otkrili su da virtosomi imaju ulogu u metastaziranju tumora. Virtosomi tumorskih stanica, nakon oslobađanja u krv, mogu ući u stanice udaljenih organa i transformirati ih u maligne stanice (40). Apoptotička tjelešca, egzosomi i ektosomi, zahvaljujući svojoj veličini, također imaju sposobnost genomastaziranja (41).

Ekstracelularne DNA klopke mogu biti neutrofilne i eozinofilne. Neutrofilne DNA klopke (NETs) oslobađaju se NETozom pri aktivaciji neutrofila. Sastoje se od DNA fragmenata i granularnih proteina, a uloga im je uništavanje različitih patogena (42). Za razliku od njih, eozinofilne DNA klopke (EETs) sadržavaju isključivo mitohondrijsku DNA te njihovo oslobađanje ne dovodi do smrti eozinofila (43). Utvrđeno je da NETs imaju ulogu u metastaziranju tumora. Istraživanje Cools-Lartigue i suradnika pokazalo je da NETs imaju sposobnost zarobljavanja tumorskih stanica u krvi što pridonosi njihovoj adheziji za endotelne stanice i metastatskoj diseminaciji (44).

**Tablica 1.** Oblici cfDNA i mehanizmi oslobađanja u krv

<b>oblik cfDNA</b>	<b>mehanizam oslobađanja</b>	<b>(Ref.)</b>
nukleosomi	apoptoza	(45)
virtosomi	aktivna sekrecija	(46)
NET	netoza	(42)
EET	aktivna sekrecija	(43)
apoptotička tjelešca	apoptoza	(47)
egzosomi	apoptoza	(47)
ektosomi	apoptoza	(47)

### 3. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA KAO BILJEG INVAZIVNOSTI

#### TROFOBLASTA

##### 3.1 Cirkulirajuća fetalna DNA

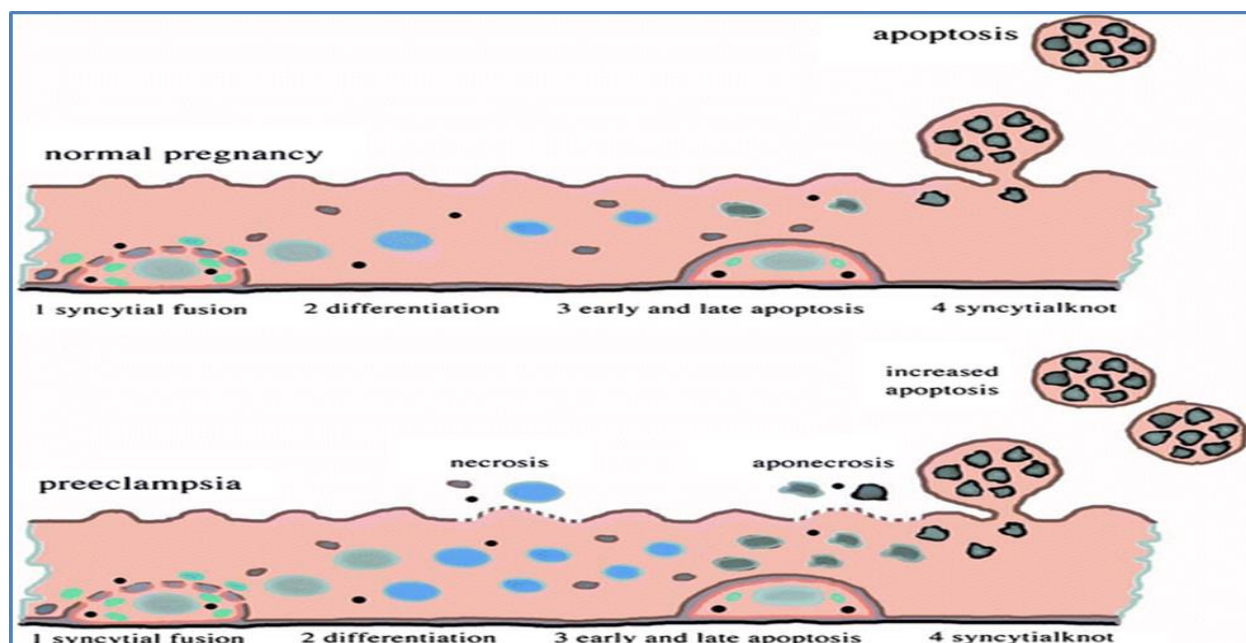
Cirkulirajuća fetalna DNA (cffDNA) čini mali udio (oko 5%) ukupne cfDNA u majčinoj krvi i može se detektirati već u 5. tjednu trudnoće (48)(49). Ona je kraća od majčine cfDNA za oko 23bp te posjeduje različite epigenetske karakteristike (50). Primjerice, dok je promotor gena *maspin* metiliran u majčnim krvnim stanicama, on nije metiliran u placenti (51). Isto tako, gen *RASSF1* (engl. Ras association domain family member 1) je hipometiliran u majčnim krvnim stanicama, ali je hipermetiliran u placenti, zbog čega se može koristiti kao marker fetalne cfDNA (52).

Budući da cfDNA većinom potječe od hematopoetskih stanica koštane srži, prvotno se smatralo da isto vrijedi i za cffDNA (53). Međutim, zbog malog broja fetalnih hematopoetskih stanica u majčinoj krvi, znalo se da one ne mogu biti jedini izvor cffDNA. To je potvrdilo istraživanje Zhonga i suradnika u kojem porast razine cffDNA nije pratio porast fetalnih eritroblasta (54).

Danas je poznato da je glavni izvor cffDNA placenta. Na to upućuje činjenica da se, relativno brzo nakon poroda, cffDNA više ne može detektirati u majčinoj krvi dok su fetalne stanice prisutne tjednima nakon poroda (55). Isto tako, u anembrionalnoj trudnoći, razine cffDNA jednake su onima u normalnoj trudnoći (56).

Glavni izvor cffDNA zapravo su stanice viloznog trofoblasta, koji prekriva površinu placentarnih resica. Čine ga unutarnji sloj mononuklearnih stanica (citotrofoblast), koji sadržava i matične stanice te vanjski sloj stanica s više jezgara i bez jasnih granica među stanicama (sinciotrofoblast) (57)(58). Tijekom trudnoće stanice viloznog trofoblasta prolaze kroz fiziološki ciklus neophodan za normalno funkcioniranje placentе. Ciklus započinje proliferacijom i diferencijacijom matičnih stanica citotrofoblasta nakon čega se diferencirane stanice stapaju sa slojem sinciotrofoblasta. Slijedi daljnja diferencijacija kako bi pridošle

stanice stekle karakteristike sinciciotrofoblasta te započele sintetizirati hormone i druge molekule neophodne za održavanje trudnoće. Budući da je sinciciotrofoblast, zbog visokog stupnja diferenciranosti, izgubio svoju sposobnost proliferacije, formira se isključivo na ovaj način. Nakon određenog vremena stanice sinciciotrofoblasta prolaze kroz apoptozu, a apoptotični materijal otpušta se u majčinu krv u obliku sincicijskih čvorića (59). Tako cffDNA dospijeva u majčinu cirkulaciju. Otpuštanje cffDNA može biti posljedica nekroze i aponekroze u patološkim stanjima poput preeklampsije i intrauterinog zastoja u rastu (engl. Intrauterine growth restriction, IUGR) (Slika 1). U ovim stanjima više razine cffDNA u majčinoj cirkulaciji mogu se pripisati nekrozi, aponekrozi i pojačanoj apoptozi stanica sinciciotrofoblasta (60).



**Slika 1.** Mehanizmi otpuštanja cffDNA u krv. U normalnoj trudnoći cffDNA se otpušta u krv apoptozom. U PE pojačana apoptoza, nekroza i aponekroza dovode do povišene koncentracije cffDNA u krvi. PE – preeklampsija, cffDNA – cirkulirajuća fetalna DNA. Preuzeto iz (61).

## **4. KOMPLIKACIJE TRUDNOĆE POVEZANE S POREMEĆENOM INVAZIJOM TROFOBLASTA**

### **4.1 Preeklampsija**

Preeklampsija (PE) je s trudnoćom povezana komplikacija koja zahvaća 2-3% svih trudnoća (62). Klinički se manifestira hipertenzijom ( $\geq 140/90$  mmHg) i proteinurijom ( $\geq 300$  mg proteina u 24-satnom urinu), a javlja se nakon 20. tjedna trudnoće (63). Ovisno o početku nastupa simptoma razlikujemo ranu (prije 34. tjedna trudnoće) i kasnu PE (nakon 34. tjedna trudnoće). Ranu PE povezujemo s intrauterinim zastojem u rastu (64).

Iako danas postoji niz teorija o nastanku ovog entiteta, još uvijek prevladava ona u kojoj uzrok PE leži u abnormalnoj placentaciji kao posljedici neodgovarajuće invazije trofoblasta. Naime, u zdravoj trudnoći, invazivni ekstravilozni trofoblast prodire u deciduu i miometrij (intersticijska invazija) te u spiralne arterije (endovaskularna invazija) što se odvija od 8. do 18. tjedna trudnoće. Proces možemo podijeliti u dvije faze gdje u prvoj fazi trofoblast invadira u spiralne arterije decidue, a u drugoj fazi miometrija. Posljedica endovaskularne invazije je remodeliranje spiralnih arterija. Stanice trofoblasta razgrađuju mišićno-elastična vlakna koja zamjenjuje amorfni fibrinoid. Tako se širi lumen spiralnih arterija, pa one postaju niskootporne i visokoprotokne krvne žile, koje omogućavaju odgovarajuću perfuziju placente (65). U PE, zbog neodgovarajuće invazije trofoblasta u drugoj fazi, izostaje fiziološka pretvorba spiralnih arterija pa one zadržavaju uski lumen dok stijenka ostaje osjetljiva na vazokonstriktivne tvari (66).

Patofiziološki, glavnu ulogu u nastanku PE ima generalizirana endotelna disfunkcija. Naime, placentarna insuficijencija dovodi do lučenja različitih tvari koje aktiviraju endotelne stanice što rezultira povećanim stvaranjem endotelina i tromboksana A<sub>2</sub>, koji dovode do vazokonstrikcije i povećavanja perifernog vaskularnog otpora, te smanjenim stvaranjem vazodilatatora poput dušikovog oksida (NO) i prostaciklina. U PE, hipertenzija je rezultat povećanja perifernog vaskularnog otpora kao i povećane osjetljivosti stanica na angiotenzin II (67).

Oksidativni stres dovodi po pojačane apoptoze stanica sinciotrofoblasta što, uz nekrozu i aponekrozu, rezultira povećanim otpuštanjem cffDNA u krv (68). Suprotno tome, niža fetalna frakcija može biti rezultat poremećenog omjera između fetalne i ukupne cfDNA, zbog porasta majčine cfDNA. Naime, sistemni upalni odgovor dovodi do aktivacije neutrofila s posljedičnim otpuštanjem NETsa koji sadržavaju cfDNA (69).

Fetalna frakcija (ff) je omjer između fetalne i ukupne cfDNA (fetalne i majčine) (70). Ona ima distribuciju u obliku zvona koja doseže maksimalne vrijednosti (10-20%) između 10. i 21. tjedna trudnoće, a mnogi biološki čimbenici mogu utjecati na njezinu veličinu (71). Tako je ff niža u majki s višim indeksom tjelesne mase (ITM) jer se apoptozom mnogobrojnih adipocita u krv oslobađaju veće količine majčine DNA (72). I gestacijska dob utječe na veličinu ff. Utvrđeno je da koncentracija fetalne DNA raste tijekom trudnoće, i to za 0.1% po tjednu, između 10. i 21. tjedna trudnoće, a nakon 21. tjedna trudnoće za 1% po tjednu (73). Kromosomopatije imaju različite učinke. Tako je ff viša u trisomiji 21, ali niža u trisomijama 13 i 18 (74). Budući da fetalna DNA potječe od placente, ff bi trebala biti dvostruko veća u blizanačkim trudnoćama. Međutim, ona je veća za oko 30%, na temelju čega zaključujemo da volumen placente ne utječe na veličinu ff (75). Ostali čimbenici koji su povezani s nižom ff su bolesti majke poput kronične hipertenzije, šećerne bolesti i hipertireoze (76).

U mnogim studijama, znanstvenici su istraživali povećane koncentracije cffDNA prije nastupa PE kao i u žena s dijagnosticiranom PE. Lo i suradnici su proveli istraživanje na malom uzorku žena te utvrdili da su razine cffDNA peterostruko veće u žena s PE u odnosu na normotenzivne žene (77). To je potvrdilo istraživanje Levina i suradnika, na većem uzorku od 240 žena, gdje je dokazana dvostruko do peterostruko veća koncentracija cffDNA. U žena koje su naknadno razvile PE koncentracija cffDNA je rasla u dva navrata: između 17. i 28. tjedna trudnoće te 3 tjedna prije nastupa simptoma (78). Kvantifikacijom gena *TSPY1* (engl. Testis-specific protein Y-linked 1) umjesto gena *SRY* (engl. Sex-determining region Y), koji se konvencionalno koristio u istraživanjima, drugi istraživači su pokazali da razine cffDNA mogu biti i do deset puta veće u žena s PE (79).



Nameće se pitanje može li se cfDNA koristiti kao biomarker za rano otkrivanje PE. Rolnik i suradnici postavili su hipotezu prema kojoj niža cfDNA ukazuje na povećani rizik za razvoj PE. Tako je u njihovom istraživanju niža cfDNA u prvom tromjesečju trudnoće nosila veći rizik od PE prije 34. i prije 37. tjedna trudnoće, bila je povezana s višim srednjim arterijskim tlakom (MAP) te pulsatilnim indeksom uterine arterije (UtAPI), kao i s nižim PAPP-A-om i PIGF-om (engl. Placental growth factor) koji se konvencionalno koriste za rano otkrivanje PE (80). Povišene koncentracije cfDNA prije nastupa simptoma ukazuju da bi se cfDNA u drugom tromjesečju trudnoće mogla koristiti kao biomarker za ranu PE (81). Rezultati ostalih studija su varirali, a zbog njihove heterogenosti, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se donio valjani zaključak.

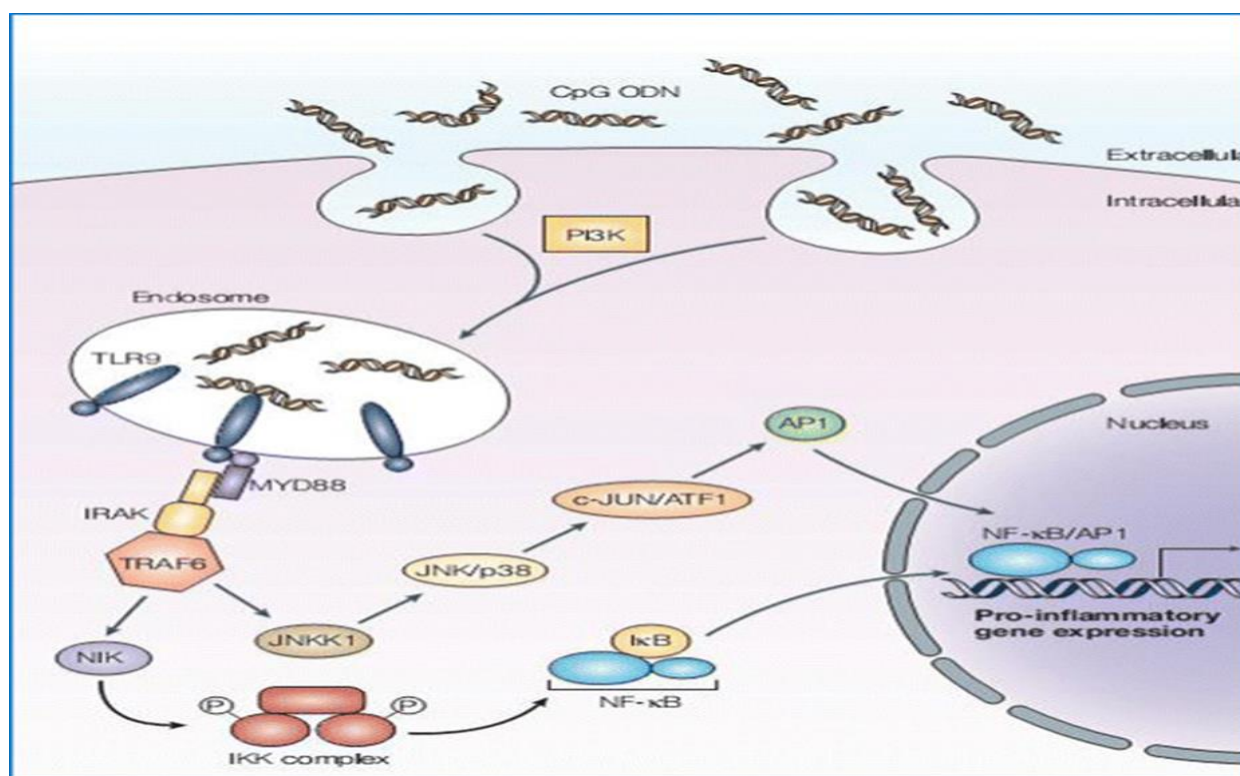
## **4.2 Intrauterini zastoje u rastu**

Intrauterini zastoj u rastu (IUGR) je poremećaj u kojem fetus ne može doseći svoj normalan potencijal rasta. Pritom se rast fetusa uspoređuje sa standardnim krivuljama rasta, a vrijednost ispod 10. centile ukazuje na IUGR. IUGR može biti uzrokovan majčnim, fetalnim i placentarnim čimbenicima pri čemu je posebno značajna placentarna insuficijencija (82). Budući da je placenta glavni izvor cfDNA, stanja koja utječu na nju utječu i na otpuštanje cfDNA (83). Istraživanja su pokazala da su razine cfDNA više u trudnoćama s IUGR uzrokovanim placentarnom insuficijencijom u odnosu na normalne trudnoće, ali i niže u odnosu na trudnoće s PE (84)(85)(86). Osim toga, kao i u PE, utvrđene su povišene koncentracije ukupne cfDNA (85).

## **4.3 Prijevremeni porođaj**

Prijevremeni porođaj je svaki porođaj prije navršenog 37. tjedna trudnoće. Dijeli se u tri skupine: spontani prijevremeni porođaj, koji započinje kontrakcijama maternice, prijevremeno prsnuće vodenjaka te jatrogeni prijevremeni porođaj. Neodgovarajuća invazija trofoblasta smatra se jednim od etioloških čimbenika u njegovom nastanku (87). Mnogim istraživanjima ukazano je na povišenje koncentracije cfDNA u trudnoća s većim rizikom od spontanog prijevremenog porođaja (88)(89). Istraživanje Scharfe-Nugent i suradnika pokazalo je da cfDNA može dovesti do spontanog prijevremenog porođaja interakcijom s TLR9 (engl. Toll-like receptor 9) (90).

Naime, cffDNA može ući u stanicu različitim mehanizmima, nakon čega ulazi u endosome. TLR9, smješten u endosomima, prepoznaje hipometilirane CpG oligodeoksiribonukleotide (ODN) fetalne DNA za koje se veže (Slika 2). Vezanje CpG ODN-a za TLR9 privlači adaptorske proteine koji aktiviraju IKK kompleks (engl. Inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase complex, IKK). On fosforilira I $\kappa$ B što rezultira njegovim odvajanjem od transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (engl. Nuclear factor- $\kappa$ B) koji se translocira u jezgru i potiče ekspresiju proinflammatoryh gena (91). To stimulira lučenje citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) i upalni odgovor koji može inducirati spontani prijevremeni porođaj (90).



**Slika 2.** Interakcija između cffDNA i TLR9. PI3K (engl. Phosphatidylinositol 3-kinase) posreduje internalizaciju CpG ODN (engl. CpG oligodeoxynucleotides) u endosome koji sadržavaju TLR9 (engl. Toll-like receptor 9). Interakcija između CpG ODN i TLR9 dovodi do aktivacije signalnih puteva koji rezultiraju translokacijom transkripcijskih faktora AP1 (engl. Activating protein 1) i NF- $\kappa$ B (engl. Nuclear factor- $\kappa$ B) u jezgru gdje potiču ekspresiju proinflammatoryh gena. Preuzeto iz (90).

## 5. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA KAO TUMORSKI BILJEG

### 5.1 Cirkulirajuća tumorska DNA

Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) je naziv koji se koristi za cfDNA tumorskih stanica. Prvotno se smatralo da ctDNA potječe od cirkulirajućih tumorskih stanica (engl. Circulating tumor cells, CTC), međutim broj CTC je premalen, u odnosu na količinu ctDNA, da bi one mogle biti glavni izvor ctDNA (91). Isto tako, u bolesnika s malignim tumorima kod kojih ne možemo detektirati prisutnost CTC, možemo ctDNA (92). Danas se smatra da stanice primarnih i metastatskih tumora otpuštaju ctDNA u krv (93).

ctDNA posjeduje specifična biokemijska i biofizikalna svojstva, poput nestabilnosti dvostrukog lanca i drugačijeg GC-sastava, koja ju razlikuju od cfDNA zdravih stanica (94). Ona je visoko fragmentirana molekula, no njezini fragmenti su duži u odnosu na fragmente cfDNA zdravih stanica, što upućuje na mehanizam njezinog otpuštanja u krv (Tablica 2). Naime, dok zdrave stanice pretežno oslobađaju cfDNA apoptozom, tumorske stanice većinom koriste nekrozu. Fragmenti DNA oslobođeni nekrozom duži su u odnosu na one oslobođene apoptozom što omogućuje razlikovanje ctDNA i cfDNA zdravih stanica (95). Osim toga, ctDNA sadržava genetske i epigenetske promjene tumorskih stanica poput točkastih mutacija, varijacija u broju kopija (engl. Copy number variation, CNV), mikrosatelitske nestabilnosti (engl. Microsatellite instability, MSI), gubitka heterozigotnosti (engl. Loss of heterozygosity, LOH) i DNA metilacije (96).

**Tablica 2.** Razlike između cfDNA zdravih stanica i ctDNA

	<b>cfDNA zdravih stanica</b>	<b>ctDNA</b>	<b>(Ref.)</b>
podrijetlo	zdrave stanice	tumorske stanice	(95)
mehanizam oslobađanja	apoptoza	nekroza	(95)
veličina	kraći fragmenti (<200bp)	duži fragmenti (>200bp)	(95)
nestabilnost dvostrukog lanca	ne	da	(94)
tumor-specifične mutacije	ne	da	(96)

ctDNA analiziramo tekućom biopsijom, koja je u odnosu na klasičnu biopsiju brža, efikasnija i minimalno invazivna metoda. Za razliku od nje, klasična biopsija je invazivna metoda koja nosi rizik od različitih komplikacija te je teško izvediva kod anatomski nepristupačnih tumora poput tumora gušterače. Mana tkivne biopsije je i u tome što ne predstavlja tumor u cijelosti. Naime, uzorak se uzima samo iz jednog područja tumora čime se zanemaruje heterogenost tumorske mase (97). Međutim, i tekuća biopsija ima svoje nedostatke. Koncentracija ctDNA je često povišena tek u uznapredovalim stadijima tumora. Isto tako, ctDNA čini samo oko 1% ukupne cfDNA što može otežati njezinu analizu (98).

Utvrđeno je da je za analizu ctDNA bolje koristiti uzorke plazme nego uzorke seruma. Naime, iako su koncentracije cfDNA 20 puta veće u uzorcima seruma, veliki dio cfDNA potječe iz leukocita, tijekom procesa zgrušavanja u epruveti za sakupljanje uzorka, što otežava detekciju ctDNA (99). Nakon uzorkovanja potrebno je izolirati cfDNA, odrediti koncentraciju cfDNA i ctDNA te detektirati genetske i epigenetske promjene ctDNA (100). ctDNA je, zbog svoje brze eliminacije iz plazme, vrlo dinamičan biomarker koji pruža informacije o trenutačnom stanju tumora. Isto tako, ponavljajućim analizama ctDNA možemo kontinuirano pratiti onkološke bolesnike (101).

## **5.2 Rano otkrivanje malignih tumora**

Budući da se veliki broj malignih tumora otkriva u kasnijim stadijima, što je povezano s lošijom prognozom, razvijaju se testovi probira (*screening*) koji bi omogućili njihovo rano otkrivanje (102). Oni podrazumijevaju postojanje specifičnog biomarkera koji bi se mogao detektirati već u ranim fazama bolesti. Jedan od takvih biomarkera je i ctDNA, specifična za tumorske stanice.

Bettegowda i suradnici proveli su istraživanje na 640 ispitanika s različitim tipovima malignih tumora u različitim stadijima. Uporabom digitalnog PCR-a (engl. Polymerase chain reaction) uspjeli su detektirati ctDNA u 47% malignih tumora u I. stadiju, 55% malignih tumora u II. stadiju te u 69% i 82% malignih tumora u III. i IV. stadiju, čime su pokazali da bi se ctDNA mogla koristiti kao biomarker za rano otkrivanje malignih tumora. Utvrdili su da detektabilnost

ctDNA ovisi o tkivnom podrijetlu tumora pa u bolesnika s gliomom ctDNA možemo otkriti u manje od 10% slučajeva (103).

ctDNA bi se mogla koristiti i u kombinaciji s drugim biomarkerima, koji se konvencionalno koriste za rano otkrivanje malignih tumora. Tako su Cohena i suradnici osmislili test, kojim su analizirali 16 mutacija ctDNA i 42 proteinska biomarkera, i primijenili ga na više od 1000 bolesnika s malignim tumorima. Kombiniranim testom uspjeli su detektirati 70% malignih tumora I., II., i III. stadija, što otvara mogućnost primjene ovakvog pristupa u budućnosti (104).

Postoji nekoliko problema kod potencijalne uporabe ctDNA kao biomarkera za rano otkrivanje malignih tumora. Jedan od njih su lažno pozitivni rezultati. Tako je u istraživanju Gormallya i suradnika detektirano 33 mutacija gena *KRAS/TP53* u zdravih pojedinaca od kojih je njih 16 razvilo maligni tumor (105). Na temelju toga zaključujemo da detekcija određene mutacije ne mora nužno značiti i prisutost malignog tumora, što bi predstavljalo značajan problem u probiru. Utvrđeno je da mutacije u zdravih osoba mogu upućivati na postojanje benignog tumora, klonalnu hematopoezu ili se može raditi o deaminacijskim mutacijama (106)(107)(108).

Problem je i utvrđivanje lokalizacije malignog tumora jer sama mutacija ne otkriva tkivno podrijetlo tumora, pogotovo zbog činjenice da se različiti maligni tumori mogu razviti kao posljedica iste mutacije. Međutim, na temelju epigenetskih karakteristika različitih tkiva moguće je utvrditi tkivno podrijetlo ctDNA, pa time i lokalizaciju malignog tumora (109).

Osim toga, kada bismo koristili ctDNA u probiru za rano otkrivanje određenog malignog tumora, morali bismo unaprijed odrediti koju mutaciju želimo detektirati. Isti maligni tumori posjeduju široki spektar različitih mutacija, zbog čega bismo morali unaprijed odrediti veliki broj mutacija, što bi značajno povećalo troškove probira (103). Međutim, novije metode poput sekvenciranja nove generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS) postaju sve dostupnije. One omogućavaju detekciju velikog broja unaprijed određenih mutacija, ali i otkrivanje mutacija *de novo* što predstavlja značajnu prednost u odnosu na starije metode (110).

### 5.3 Rano otkrivanje relapsa bolesti

Nakon operacije i drugih kurativnih postupaka dio tumorskog tkiva može ostati neotkriven i dovesti do relapsa bolesti. Rano otkrivanje relapsa bolesti standardno se temelji na prisutnosti kliničkih simptoma, radiološkim pretragama i proteinskim biomarkerima koji nisu dovoljno učinkoviti u ranoj detekciji (111). Tie i suradnici analizirali su ctDNA nakon kirurške resekcije u bolesnika s kolorektalnim karcinomom drugog stupnja. Rezultati su pokazali da prisutnost ctDNA nakon operacije upućuje na postojanje rezidualne bolesti s visokim rizikom za relaps. Osim toga, ctDNA se pokazala boljim biomarkerom u ranom otkrivanju relapsa u odnosu na konvencionalno korišten karcinoembrionalni antigen (CEA) (112). I druga istraživanja potvrdila su učinkovitost ctDNA u ranom otkrivanju relapsa kod karcinoma gušterače, karcinoma pluća i difuznog B-velikostaničnog limfoma (engl. Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) (113)(114)(115). Ona su pokazala da važnost ctDNA leži u mogućnosti otkrivanja relapsa nekoliko mjeseci prije standardnih metoda.

### 5.4 Praćenje odgovora na terapiju

Tekuća biopsija s analizom ctDNA može se koristiti i za praćenje odgovora na terapiju. Značajan pad koncentracije ctDNA korelira s dobrim terapijskim odgovorom, dok porast razine ctDNA tijekom liječenja upućuje na progresiju bolesti (116). Uz to, analizom ctDNA mogu se otkriti mutacije koje dovode do rezistencije na terapiju. Primjerice, u bolesnika s nesitnostaničnim karcinomom pluća (engl. Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) često je prisutna mutacija gena *EGFR* (engl. Epidermal growth factor receptor). U slučaju prisutne mutacije primjenjuju se lijekovi koji inhibiraju receptorsku tirozin kinazu (117). Međutim, u 50% bolesnika razvit će se rezistencija na potonju terapiju i progresija bolesti zbog mutacije u egzonu 20 *EGFR* (*T790M*), koja se može detektirati u ctDNA (118). Analizom ctDNA moguće je otkriti i nove, do tada nezabilježene, mutacije koje dovode do terapijske rezistencije (119). Osim toga, utvrđeno je da uporabom ctDNA za detekciju rezistentnog klona, možemo otkriti progresiju bolesti nekoliko mjeseci prije radioloških pretraga te na taj način usmjeriti daljnje liječenje (120).

## 6. SERUMSKA CIRKULIRAJUĆA DNA U REPRODUKTIVNIM

### TUMORIMA

Rak jajnika je 6. najčešći maligni tumor u žena te je najsmrtonosniji tumor ženskog reproduktivnog sustava (121). Njegova visoka stopa smrtnosti većinom je posljedica kasne dijagnoze. Naime, simptomi često nisu dovoljno specifični da bi upućivali na postojanje bolesti, pa se on najčešće (u 75% slučajeva) otkriva u III. i IV. stadiju (122).

Za rano otkrivanje raka jajnika mogu se koristiti bimanualni pregled zdjelice, ugljikohidratni antigen 125 (engl. Carbohydrate antigen 125, CA125) i transvaginalni ultrazvučni pregled. Međutim, oni su se pokazali nedovoljno učinkovitima, pogotovo u ranom stadiju. Tako je CA125 povišen u 80% bolesnica s rakom jajnika, ali u I. stadiju može otkriti bolest samo u oko 50% slučajeva (123)(124). Uz to, točnost transvaginalnog ultrazvučnog pregleda uvelike ovisi o ginekologu koji ga izvodi (125). Stoga se logično nameće potreba za otkrivanjem i implementiranjem boljih metoda ranog otkrivanja raka jajnika u kliničku praksu, poput uporabe ctDNA.

Koncentracija ctDNA značajno je viša u žena s rakom jajnika u odnosu na žene s benignim tumorom jajnika i zdrave žene. Osim toga, koncentracija ctDNA ovisi o stadiju bolesti pa je ona najviša u raku jajnika IV. stadija (126). Rezultati metaanalize, koja je uključivala 9 studija, pokazali su da ctDNA ima dovoljnu specifičnost (90%), ali ne i osjetljivost (70%) za dijagnosticiranje raka jajnika (127). Međutim, ona bi se mogla koristiti u kombinaciji s drugim metodama čime bi se povećala osjetljivost, tj. vjerojatnost točnog otkrivanja bolesnih osoba (126).

U terapiji uznapredovalog karcinoma jajnika primjenjuje se kirurško liječenje u kombinaciji s adjuvantnom kemoterapijom karboplatinom i taksanom. Nakon primijenjene terapije bolesnici se konvencionalno prate mjerenjem koncentracije CA125 i kompjuteriziranom tomografijom (CT) (128). Međutim, povišena koncentracija CA125 nakon primijenjene terapije može biti uzrokovana endometriozaom, leiomiomom, menstruacijom, trudnoćom i drugim stanjima, tako

da ona ne mora upućivati na loš terapijski odgovor (129). Uz to, CA125 ima dugo poluvrijeme života (9 do 44 dana) pa ne predstavlja dinamičan biomarker poput ctDNA (130). Uporaba ctDNA u praćenju bolesnika imala bi brojne prednosti. Utvrđeno je da odsustvo ctDNA nakon primijenjene terapije sa sigurnošću upućuje na dobar terapijski odgovor te da koncentracija ctDNA korelira s duljinom preživljenja. Osim toga, relaps bolesti se, praćenjem koncentracije ctDNA, može otkriti nekoliko mjeseci ranije u odnosu na CT (131).

ctDNA se može koristiti i za otkrivanje mutacija koje dovode do rezistencije na primijenjenu terapiju. Oko 25% nasljednih raka jajnika uzrokovano je mutacijom tumorsupresorskih gena *BRCA1* (engl. BReast CAncer gene 1) i *BRCA 2* (engl. BReast CAncer gene 2) koji kodiraju proteine za popravak dvolančanih lomova DNA (132). U bolesnika s ovom mutacijom može se primijeniti ciljana terapija PARP (engl. Poly (ADP ribose) polymerase) inhibitorima. PARP inhibitori dovode do perzistentnih DNA lezija, koje tumorske stanice ne mogu popraviti, što rezultira njihovom smrću (133). Međutim, tijekom liječenja, mogu se razviti nove mutacije koje barem djelomično vraćaju funkciju proteina BRCA i dovode do rezistencije na PARP inhibitore (134). Ove mutacije se mogu detektirati analizom ctDNA (135).

Osim u raku jajnika, istražuje se i primjena ctDNA u ranom otkrivanju drugih reproduktivnih tumora, za koje ne postoji *screening*, poput karcinoma endometrija. Dobrzycka i suradnici proveli su istraživanje na 109 žena s karcinomom endometrija, od kojih je njih 87 imalo karcinom endometrija tipa 1 (ovisan o estrogenima), a 22 karcinom endometrija tipa 2 (neovisan o estrogenima). Detektirali su ctDNA u I. stadiju karcinoma endometrija tipa 2 u 60% slučajeva, ali u I. stadiju karcinoma endometrija tipa 1 samo u 3.8% slučajeva, na temelju čega zaključujemo da bi se ctDNA potencijalno mogla koristiti samo kao biomarker za rano otkrivanje karcinoma endometrija tipa 2. Osim toga, koncentracija ctDNA je korelirala sa stadijem karcinoma endometrija tipa 2, ali ne i tipa 1 (136). Rezultati drugog istraživanja pokazali su da koncentracija ctDNA ovisi i o histološkom gradusu tumora, pa je ona bila najviša u slabo diferenciranih tumora gradusa 3 (G3) (137). S druge strane, u istraživanju Tanake i suradnika koncentracija ctDNA je bila viša u žena s karcinomom endometrija nego u žena s benignim tumorom endometrija i zdravih žena, ali koncentracija ctDNA nije bila povezana sa stadijem niti s histološkim gradusom tumora (138).



Od svih reproduktivnih tumora najspecifičniji je karcinom vrata maternice, uzrokovao infekcijom humanim papiloma virusom (HPV), čija se DNA ugrađuje u humani genom (139). Budući da se virusna DNA razlikuje od humane DNA, virusni geni se mogu lako detektirati unutar cfDNA. Tako su u istraživanju Cheunga i suradnika virusni geni *E7* i *L1* bili uspješno detektirani unutar cfDNA. Osim toga, količina detektiranih gena korelirala je s rizikom za relaps i 5-godišnjim preživljenjem, zbog čega bi se cfDNA u budućnosti mogla koristiti kao biomarker za praćenje žena s karcinomom vrata maternice (140).

## 7. ZAKLJUČAK

Otkriće serumske cirkulirajuće DNA (cfDNA) otvorilo je novu eru u suvremenoj medicini. cfDNA se u zdravih osoba nalazi u niskoj koncentraciji i potječe od stanica s visokim proliferativnim kapacitetom, dok je u patološkim stanjima njezina koncentracija znatno viša. U komplikacijama trudnoće, pojačanom apoptozom, nekrozom i aponekrozom stanica sinciotrofoblasta, cirkulirajuća fetalna dna (cffDNA) dopijeva u majčinu cirkulaciju. cffDNA se može koristiti za rano otkrivanje komplikacija trudnoće, naročito prijevremenog porođaja, gdje je utvrđen i mehanizam kojim može inducirati spontani prijevremeni porođaj. ctDNA se, na temelju mehanizma otpuštanja u krv, veličine DNA fragmenata i tumor-specifičnih mutacija, može razlikovati od cfDNA zdravih stanica. Unatoč tome, postoje određeni problemi koji priječe njezinu uporabu u ranom dijagnosticiranju malignih tumora, a što bi se trebalo riješiti daljnjim istraživanjima. S druge strane, ponavljanim uzorkovanjem i praćenjem koncentracije ctDNA možemo otkriti relaps bolesti i rezistenciju na terapiju ranije nego drugim metodama, zbog čega bi se ona trebala koristiti za praćenje bolesnika s malignim tumorima.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med., na pristupačnosti, savjetima i korekcijama tijekom odabira teme i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svojoj obitelji i najbližim prijateljima na strpljenju, razumijevanju i podršci, koje su mi pružali tijekom cijelog života, a naročito tijekom studija.

## 9. LITERATURA

1. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*. 1948;142:241–243.
2. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research*. 1977;37(3):646–650.
3. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318–322.
4. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*. 1994;86(4):774–779.
5. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485–487.
6. Lo YM: Fetal DNA in maternal plasma: Biology and diagnostic applications. *Clin Chem* 46: 1903 1906, 2000.
7. Lo YM, Lau TK, Zhang J, et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem*.1999; 45(10): 1747–1751
8. Beard J. Cancer genesis. *The Lancet* 1904;164(4238):1447–8.
9. Doello K. The role of trophoblastic epigenetic reprogramming in benign tumor cells on malignant progression: A molecular hypothesis. 2018.
10. Bulut I, Coskun A, Ciftci A, Cetinkaya E, Altıay G, Caglar T, et al. Relationship between pregnancy-associated plasma protein-A and lung cancer. *Am J Med Sci* 2009;337(4):241–4.
11. Prithviraj P, Anaka M, McKeown S, Permezel M, Walkiewicz M, Cebon J, et al. Pregnancy associated plasma protein-A links pregnancy and melanoma progression by promoting cellular migration and invasion. *Oncotarget* 2015;6(18):15953–65.
12. Becker M, Haluska P, Bale L, Oxvig C, Conover C. A novel neutralizing antibody targeting pregnancy-associated plasma protein-a inhibits ovarian cancer growth and ascites accumulation in patient mouse tumorgrafts. *Mol Cancer Ther* 2015;14(4):973–81.
13. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003;24(1):53–64.

14. Li, Y., Klausen, C., Cheng, J. C., Zhu, H. & Leung, P. C. Activin A, B, and AB increase human trophoblast cell invasion by up-regulating N-cadherin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2216–E2225 (2014).
15. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10,1580–1594 (1996).
16. Zhao HJ, Klausen C, Li Y, Zhu H, Wang YL, Leung PCK. Bone morphogenetic protein 2 promotes human trophoblast cell invasion by upregulating N-cadherin via non-canonical SMAD2/3 signaling. *Cell Death Dis* 2018;9(2):4–15.
17. Kokkinos, M. I., Murthi, P., Wafai, R., Thompson, E. W. & Newgreen, D. F. Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta* 31,747–755 (2010).
18. Clement, J. H. et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 27,401–407 (2005).
19. Kim, B. R. et al. BMP-2 induces motility and invasiveness by promoting colon cancer stemness through STAT3 activation. *Tumour Biol.* 36, 9475–9486 (2015).
20. Kang, M. H., Kim, J. S., Seo, J. E., Oh, S. C. & Yoo, Y. A. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. *Exp. Cell Res.* 316,24–37 (2010).
21. Chen, X., Liao, J., Lu, Y., Duan, X. & Sun, W. Activation of the PI3K/Akt pathway mediates bone morphogenetic protein 2-induced invasion of pancreatic cancer cells Panc-1. *Pathol. Oncol. Res.* 17, 257–261 (2011).
22. Cole LA: hCG, five independent molecules. *Clin Chim Acta* 2012;413:48-65.
23. Lyytinen I, Lempinen M, Nordin A, Mäkisalo H, Stenman UH, Isoniemi H: Prognostic significance of tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) and human chorionic gonadotropin- $\beta$  (hCG $\beta$ ) in patients with hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2013;48:1066-1073.
24. Hotakainen K, Ljungberg B, Haglund C, Nordling S, Paju A, Stenman UH: Expression of the free beta-subunit of human chorionic gonadotropin in renal cell carcinoma: prognostic study on tissue and serum. *Int J Cancer* 2003;104:631-635.
25. Nishimura R, Koizumi T, Morisue K, Yamanaka N, Lalwani R, Yoshimura M, Nakagawa T, Shii K, Hasegawa K, Baba S: Expression and secretion of the beta subunit of human chorionic gonadotropin by bladder carcinoma in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1995;55:1479-1484

26. Li J, Yin M, Song W, Cui F, Wang W, Wang S, et al. B Subunit of Human Chorionic Gonadotropin Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis of Early-Stage Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(1):237–49.
27. Fleischhacker, M. and Schmidt, B. (2007) Circulating Nucleic Acids (CNAs) and Cancer—A Survey. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775, 181-232.
28. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14:985–90.
29. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* 2016;14(10):898–908.
30. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljansky, M. (1989) Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology*, 46, 318-322.
31. Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M. and Schendure, J. (2016) Cell-Free DNA Comprises an in Vivo Nucleosome Footprint That Informs Its Tissues-of- Origin. *Cell*, 164, 57-68.
32. A. R. Thierry<sup>1</sup>, S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker, M. Stroun (2016) Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology, *Cancer Metastasis Rev* 35:347–376.
33. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411:1611-24.
34. Choi J, Reich CF, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. 2005;115:55-62.
35. Mouliere F, Thierry AR (2012) The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(S1):S209–S215.
36. Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, Laktionov PP (2012) Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(Suppl 1):S141–153.
37. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV (2004) Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1022:221–227.

38. Mittra I, Nair NK, Mishra PK (2012) Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *Journal of Biosciences* 37(2):301– 312.
39. Gahan PB, Stroun M (2010) The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochemistry and Function* 28(7):529–538.
40. Garcí'a-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcí'a-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol.* 2004;19:575–83.
41. Peters DL, Pretorius PJ (2012) Continuous adaptation through genetic communication - a putative role for cell-free DNA. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(Suppl 1):S127–132.
42. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)* 303(5663):1532–1535.
43. Yousefi S, Simon D, Simon H-U (2012) Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Current Opinion in Immunology* 24(6):736–739.
44. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Ferri L (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, doi:10.1172/JCI67484
45. Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB (1977) Circulating nucleic acids in higher organisms. *International Review of Cytology* 51:1–48.
46. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY (2007) Extracellular nucleic acids. *BioEssays* 29(7):654–667.
47. Hahn S, Giaglis S, Buser A, Hoesli I, Lapaire O, Hasler P. Cell-free nucleic acids in (maternal) blood: any relevance to (reproductive) immunologists? *Journal of reproductive immunology.* 2014; 104–105:26–31.
48. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Seminars in fetal & neonatal medicine.* 2008; 13(2):69–75.
49. K.C.A. Chan, J. Zhang, A.B.Y. Hui, N. Wong, T.K. Lau, T.N. Leung, et al., Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 50 (2004) 88–92.
50. S.S.C. Chim, Y.K. Tong, R.W.K. Chiu, T.K. Lau, T.N. Leung, L.Y.S. Chan, et al., Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 14753–14758.

51. R.W.K. Chiu, S.S.C. Chim, I.H.N. Wong, C.S.C. Wong, W.-S. Lee, K.F. To, et al., Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas, *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 941–950.
52. D.W. Bianchi, Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review, *Placenta* 25 (Suppl. A) (2004) S93–S101.
53. X.Y. Zhong, W. Holzgreve, S. Hahn, Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts, *Mol. Hum. Reprod.* 8 (2002) 864–870.
54. Hahn S, Huppertz B and Holzgreve W: Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 26: 515-526, 2005.
55. M. Alberry, D. Maddocks, M. Jones, M. Abdel Hadi, S. Abdel-Fattah, N. Avent, et al., Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast, *Prenat. Diagn.* 27 (2007) 415–418.
56. Geier G, Schuhmann R, Kraus H. Regional unterschiedliche Zell- proliferation innerhalb der Plazentone reifer menschlicher Plazen- ten. Autoradiographische Untersuchungen. *Arch Gynakol* 1975; 218: 31–7.
57. Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 4th ed. Springer, New York, 2000.
58. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast-role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11:353–62.
59. Litton C, Stone J, Eddleman K and Lee MJ: Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* 76: 521-528, 2009.
60. Mourad M, Jain J, Mehta MP, Feinberg BB, Burwick RM. Are We Getting Closer to Explaining Preeclampsia? *Curr Obstet Gynecol Rep* 2016;5(3):264–72.
61. O’Gorman N, Wright D, Rolnik DL, et al. Study protocol for the randomised controlled trial: combined multimarker screening and randomised patient treatment with ASpirin for evidence-based PREeclampsia prevention (ASPRE). *BMJ Open.* 2016; 6(6): e011801
62. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–99.
63. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:40 – 49.
64. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arte- rial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983;4:397–413.



65. Roberts JM. Pathophysiology of ischemic placental disease. *Semin Perinatol* 2014;38:139–45.
66. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertens* 2001;38(3 Pt 2):718–22.
67. Allaire, A.D., Ballenger, K.A., Wells, S.R., McMahon, M.J., Lessey, B.A., 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 96 (2), 271–276.
68. Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, Hoesli I, Lapaire O, Giaglis S. Elevated Levels of Total Cell-FreeDNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps. *Fetal diagnosis and therapy.* 2016; 40(4):263–7.
69. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013; 33(7):667–74.
70. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41(1): 26–32.
71. Haghiac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20(11):2213–9.
72. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013; 33(7):662–6.
73. Rava, RP.; Sehnert, AJ.; Bianchi, DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem.* 2013.
74. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrich M, van den Boom D, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn.* 2012; 32(8):730–4.
75. Y. Zhou, Z. Zhu, Y. Gao, Y. Yuan, Y. Guo, L. Zhou, et al., Effects of maternal and fetal characteristics on cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma, *Reprod. Sci. (Thousand Oaks, CA)* 22 (2015) 1429–1435.
76. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ and Redman CW: Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45:184-188, 1999.

77. Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, Wataganara T, Romero R and Bianchi DW: Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 190: 707-713, 2004.
78. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W and Hahn S: Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 51: 1598-1604, 2005.
79. Rolnik DL, da Silva Costa F, Lee TJ, et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018; 52(6): 722–72.
80. Contro E, Bernabini D, Farina A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagnosis Ther*. 2017;21(2):125–35.
81. Cetin I, Foidart JM, Miozzo M, et al: Fetal growth restriction: a workshop report. *Placenta* 25: 753-757, 2004.
82. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*. 2014;35 Suppl:S64–8.
83. Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metawi H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, Avent ND and Soothill PW: Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 200: e1-e6, 2009.
84. Al Nakib M, Desbriere R, Bonello N, Bretelle F, Boubli L, Gabert J and Levi-Mozziconacci A: Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther* 26: 24-28, 2009.
85. Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, Tirosh D, Benshalom-Tirosh N, Mastrolia SA, et al. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation. *PLoS One*. 2018;13(7):1–15.
86. Cunningham FR Williams Obstetrics, 22nd Edition Mc Graw-Hill, 2005.
87. Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N and Bianchi DW: High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 193: 421-425, 2005.
88. Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, Dziegiel MH and Tabor A: High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn* 32: 840-845, 2012.

89. Scharfe-Nugent A, Corr SC, Carpenter SB, Keogh L, Doyle B, Martin C, Fitzgerald KA, Daly S, O'Leary JJ and O'Neill LA: TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *J Immunol* 188: 5706-5712, 2012.
90. Klinman DM (2004) Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews Immunology* 4(4):249– 259.
91. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10(8):472–484.
92. De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santaripa L, Vivancos A, Tabernero J, Reis-Filho JS, et al. Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013;10:377-89.
93. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer*. 2013;133:346–56.
94. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljansky, M. (1989) Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology*, 46, 318-322.
95. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34(12):662-81.
96. Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13(8):827–44.
97. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem*. 2014.
98. Yamauchi M, Urabe Y, Ono A, Miki D, Ochi H, Chayama K. Serial profiling of circulating tumor DNA for optimization of anti-VEGF chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2018;142(7):1418–26.
99. Lee T, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41:276-82.
100. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, Kopeckova M, Minarikova P, Lipska L, et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Analytical Biochemistry*. 2013(433):227-34.
101. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11:426.

102. Moyer VA. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med* 2014;160:330-8.
103. Bettegowda C, Sausen M, Leary R, Kinde I, Agrawal N, Bartlett B, et al. Detection of circulating tumor DNA in early and late stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;16:224ra24.
104. Cohen JD, Li L, Wang Y et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 359(6378):926–930.
105. Gormally E. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer Res* 2006;66:6871-6.
106. Bartels S, Persing S, Hasemeier B, et al. Molecular Analysis of Circulating Free DNA from Lung Cancer Patients in Routine Laboratory Practice: A Cross-Platform Comparison of Three Different Molecular Methods for Mutation Detection. *J Mol Diagn*. 2017;10.1016/j.jmoldx.2017.05.008
107. Volckmar AL, Leichsenring J, Flechtenmacher C, et al. Tubular, lactating, and ductal adenomas are devoid of MED12 Exon2 mutations, and ductal adenomas show recurrent mutations in GNAS and the PI3K-AKT pathway. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;(56):11-17.
108. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;(500):415-421.
109. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E1826-34.
110. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158–65.
111. Chao M and Gibbs P. Caution is required before recommending routine carcinoembryonic antigen and imaging follow-up for patients with early stage colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:e279-80
112. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8: 346ra92.
113. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun* 2015;6:7686.
114. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early stage lung cancer evolution. *Nature* 2017;545:446-51.

115. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with un- treated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015;16:541-9.
116. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Cir- culating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2007;14:985- 90.
117. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, LopezVivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Eng J Med*. 2009;361:958-67.
118. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *CLIN CANCER RES* 2011 2011-12-15; 17(24): 7808-15.
119. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun* 2016;7:11815.
120. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012 Jun 28; 486(7404): 532-6.
121. Šekerija M, Cukelj P. Epidemiology of ovarian cancer in Croatia. *Libr Oncol*. 2015;43(1–3):3–8.
122. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*. 2000; 89:2068–2075.
123. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(3):183–203.
124. Soletormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RH, Tholander B, Bast RC Jr., et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2015.
125. Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, Bozzetti MC. Accuracy of ultrasonography with color Doppler in ovarian tumor: a systematic quantitative review. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer*. 2009.
126. Shao X, He Y, Ji M, Chen X, Qi J, Shi W, et al. Quantitative analysis of cell free DNA in ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2015;10(6):3478–82.

127. Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M, et al. Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0155495.
128. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology:Ovarian Cancer [Internet]. 2015.
129. McMeekin DS, Mannel RS, Di Saia PJ. CHAPTER10: TheAdnexalMass. In: *ClinicalGynecologic Oncology* [Internet]. 8th ed. Elsevier; 2012. p.
130. Riedinger JM, Wafflart J, Ricolleau G, Eche N, Larbre H, Basuyau JP, et al. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol*. 2006 Aug;17(8):1234-8.
131. Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, Sebra R, Catalina Camacho S, Garnar-Wortzel L, et al. Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One*. 2015 Dec 30;10(12):e0145754.
132. Cooper GM, Hausman RE. cooper. In: *Stanica*. 5. 2010. p. 759.
133. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005; 434: 917-921.
134. B. Norquist, K.A. Wurz, C.C. Pennil, R. Garcia, J. Gross, W. Sakai, et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas *J. Clin. Oncol.*, 29 (2011), pp. 3008-3015.
135. Christie E.L., Fereday S., Doig K., Pattnaik S., Dawson S.-J., Bowtell D.D.L. Reversion of BRCA1/2 germline mutations detected in circulating tumor DNA from patients with high-grade serous ovarian cancer. *J. Clin. Oncol*. 2017;35:1274–1280.
136. Dobrzycka B., Terlikowski S.J., Mazurek A., Kowalczyk O., Niklinska W., Chyczewski L., Kulikowski M. Circulating Free DNA, P53 Antibody and Mutations of KRAS Gene in Endometrial Cancer. *Int. J. Cancer*. 2010;127:612–621. doi: 10.1002/ijc.25077.
137. Cicchillitti L., Corrado G., De Angeli M., Mancini E., Baiocco E., Patrizi L., Zampa A., Merola R., Martayan A., Conti L., et al. Circulating Cell-Free DNA Content as Blood Based Biomarker in Endometrial Cancer. *Oncotarget*. 2017;8:115230–115243.
138. Tanaka H., Tsuda H., Nishimura S., Nomura H., Kataoka F., Chiyoda T., Tanaka K., Iguchi Y., Susumu N., Aoki D. Role of Circulating Free Alu DNA in Endometrial Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2012;22:82–86.

139. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189:12–19.
140. Cheung TH, Yim SF, Yu MY, Worley MJ, Fiascone SJ, Chiu RWK, et al. Liquid biopsy of HPV DNA in cervical cancer. *J Clin Virol.* 2019;114:32–6.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 04.05.1993. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Vladimira Nazora 2007. godine u Zagrebu. Maturirala sam 2011. godine u zagrebačkoj II. gimnaziji te iste godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Članica sam Studentske sekcije za dermatovenerologiju i udruge CroMSIC (Croatian Medical Students' International Committee) te redovito sudjelujem u projektu „Natjecanje u kliničkim vještinama“ EMSA-e (European Medical Students' Association). Govorim engleski i talijanski jezik.